

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE QUIMICA INDUSTRIAL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

KAROLINY CARDOSO VERA CRUZ

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO FITOQUÍMICO
DE *Duguetia furfuracea*

DOURADOS
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

KAROLINY CARDOSO VERA CRUZ

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO FITOQUÍMICO
DE *Duguetia furfuracea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Industrial da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do título de graduado em Química Industrial, sob orientação do Professora Dr.^a Anelise Samara Nazari Formagio.

DOURADOS
2016

Cruz, Karoliny Cardoso Vera
Atividade antioxidante e estudo fitoquímico de *Duguetia furfuracea* /Karoliny Cardoso Vera Cruz. Dourados: UEMS, 2016.
27p.; 30 cm

Monografia (Graduação) – Química Industrial – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.

Orientador: Professora Dr.^a Anelise Samara Nazari Formagio

1. Antioxidante 2. *Duguetia furfuracea* 3. Compostos fenólicos I. Título

BANCA EXAMINADORA

- | | |
|---|---------------|
| 1. Dr ^a . Anelise Samara Nazari Formagio | QUÍMICA/ UEMS |
| 2. Dr ^a . Claudia Andrea Lima Cardoso | QUÍMICA/ UEMS |
| 3. Carla Roberta Ferreira Volobuff | UFGD |

Dourados, 29 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida sozinha. No decorrer desses anos de luta e aprendizado alguma pessoas estiveram ao meu lado e percorreram esta caminhada como verdadeiros pilares, me deixando sempre de pé para conseguir conquistar meu sonho.

Agradeço primeiramente a Deus, que me ouviu nos momentos difíceis, me confortou e me deu sabedoria pra vencer mais essa etapa.

Agradeço também aos meus pais, Valéria e Gilson que me ensinaram a ser uma mulher de força para enfrentar a vida, que me deixou livre para seguir minhas escolhas, porém sempre indicando o caminho correto. Á minhas irmãs Kariny e Kamila que mesmo pela distância sempre estavam me apoiando e me incentivando em todos os momentos.

Agradeço também todos da minha família, por ter me dado total apoio nas minhas escolhas e sempre me incentivando, especialmente para minha avó Zélia minha tia Valquiria e meu tio Farias que foram de extrema importância nesses meus anos de luta.

Aos meus amigos e colegas de classe, que me proporcionaram momentos especiais, alegria e aprendizado. Especialmente para meus amigos e irmãos que a faculdade me deu Marcelo e Belisa, pois só a gente sabe quanto fomos importantes um na vida do outro durante esses 4 anos, o grande trio ternura.

A minha segunda família que Deus me presenteou, obrigada novamente Marcelo por ter me presenteado com sua linda família que me acolheu de braços abertos. Agradeço eternamente por tudo que vocês fizeram por mim e essa conquista também é de vocês.

Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho.

A todos os professores que compartilharam seus conhecimentos e seus experiências agregando na minha vida acadêmica, pessoal e profissional. Especialmente para as professoras, amiga e minha orientadora e co-orientadora, Anelise Formagio e Claudia Andrea, que foram essenciais para minha formação e na elaboração desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O extrato metanólico das folhas da *Duguetia furfuracea* e as frações obtidas do particionamento líquido-líquido do extrato metanólico foram avaliados para determinação de concentrações de compostos fenólicos, taninos, flavonóides e flavonóis. A composição química do extrato metanólico utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/EM). Além disso foi avaliado também a atividade antioxidante das frações utilizando os métodos: 1,1-difenil-1-picrilhidrazil radical livre (DPPH), β -caroteno branqueamento e 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). As concentrações de constituintes foram medidas espectrofotometricamente, os flavonoides e flavonol, todas as amostras exibiram um baixo teor de constituintes fenólicos. A FAE exibiu maior teor de flavonoides e fenóis em relação as demais amostras, 57,46 EQ mg/ g amostra e 47,49 EAG mg/ g amostra respectivamente, a FHM exibiu maior teor de taninos com 28,00 ECAT mg/ g amostra. A FAE foi o antioxidante mais efetivo ($IC_{50}=36,32\mu\text{L/mL}$) no método de sequestro de radicais livres DPPH, porém em relação ao método de radicais livre ABTS e no ensaio de β -caroteno/ácido linoleico a FHM demonstrou maior atividade antioxidante, a atividade antioxidante das frações da *D. furfuracea* é devido aos alcaloides aporrfínicos e oxaporrfínicos presentes na planta. .

Palavras-chave: Araticum-do-cerrado, DPPH, ABTS, β -caroteno/ácido linoleico, constituintes químicos, alcaloide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 <i>Duguetia furfuracea</i>	9
1.2 Atividade Antioxidante.....	10
1.2.1 Sequestro de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).....	10
1.2.2 Captura do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).....	12
1.2.3 Co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo Específico.....	14
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Coleta do material vegetal.....	14
3.2 Extração e isolamento de constituintes químicos.....	14
3.3 Análise fitoquímica.....	15
3.4 Perfil fitoquímico por CL/EM.....	15
3.5 TEOR DE CONSTITUINTES.....	16
3.5.1 Concentração de fenóis.....	16
3.5.2 Concentração de taninos condensados.....	16
3.5.3 Concentração de flavonóides.....	17
3.5.4 Concentração de flavonol.....	17
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
3.6.1 Sequestro de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).....	18
3.6.2 Co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico.....	18
3.6.3 Captura do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Constituintes químicos.....	19
4.2 Atividade antioxidante.....	20
5 CONCLUSÃO.....	23
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AlCl_3 – cloreto de alumínio

BHT – butil-hidroxitolueno

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada por partição

CHCl_3 – clorofórmio

CL – cromatografia líquida

CL/EM - cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massa

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ – radical carbonato

DF-1 – código do compostos isolado

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EAG – equivalente de ácido gálico

ECAT – equivalente de catequina

EHM – extrato hidrometanólico

EM – espectrômetro de massa

EQ – equivalente de quercetina

ESI – ionization electrospray

FAE – fração acetato de etila

FC – fração clorofórmio

FH – fração hexano

FHM – fração hidrometanólica

H_2O - água

H_2O_2 – peróxido de oxigênio

HCL – ácido clorídrico

HOCl – ácido hipocloroso

MeOH – metanol

NaC₂H₃O₂ – acetato de sódio

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

O₂[·] – radical superóxido

OCH₂O – metilenodioxido

OH[·] – radical hidroxila

OMe – oximetílico

RMN – ressonância magnética nuclear

TMS – tetrametilsilano

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Duguetia furfuracea*

Duguetia furfuracea (A. St. Hil.) Benth. e Hook. f., (Annonaceae), figura 1, é um arbusto típico do cerrado da região central do Brasil sendo frequente em Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais. É conhecida popularmente como “araticum-do-cerrado” ou “araticum-do-campo” (SOUZA, LORENZI, 2005). Por sua alta capacidade de crescimento vegetativo, é considerada uma planta daninha (LORENZI, 2000).

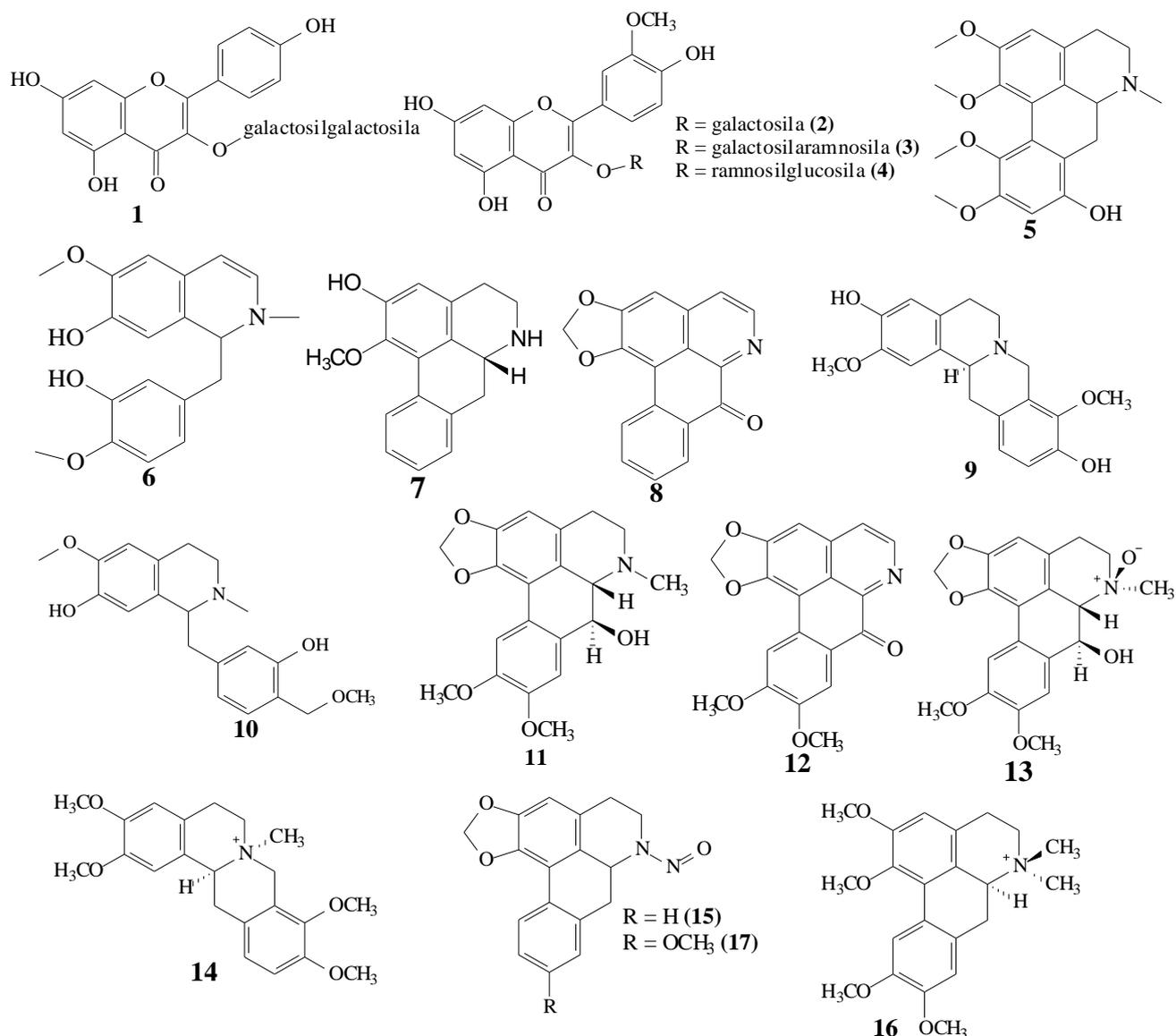
Figura 1: Imagem da *Duguetia furfuracea*.



Na medicina popular, o chá das folhas da *D. furfuracea* são empregadas para tratamento de dores nos rins e coluna, contra problemas e distúrbios gastrointestinais como diarreia, dores no estômago e também para tratamento de reumatismo (FRANÇA et al, 2008; VALTER, et al. 2008).

O estudo fitoquímico do óleo essencial obtido das folhas de *D. furfuracea* demonstrou a presença de sesquiterpenos, monoterpenos (CAROLLO et al., 2005; FISCHER et al., 2014). Em estudos anteriores foram identificados flavonoides glicosilados das folhas de *D. furfuracea*: 3-*O*-galactosilgalactosil-kaempferol (1), 3-*O*-galactosil-isoramnetina (2), 3-*O*-galactosilramnosil-isoramnetina (3) e 3-*O*-ramnosilglucosil-isoramnetina (4) (VALTER et al., 2008). Além disso, tem relato dos seguintes alcaloides aporfínicos isolados 1,2,10-trimetoxi-8,11-dihidroxi-aporfínico (5), isocoridina, norisocoridina, xilopina, anonaina (6), obovanina, asimilobina (7), aterospermidina, liriodenina (8), bisbenziltetraidroisoquinolínico, isocondodendrina; discretamina (9), reticulina (10), duguetina (11), dicentrinona (12), duguetina-N-óxido (11), N-metiltetraidropalmatina (13), N-nitrosoanonaina (15), N-metilglaucina (14), N-nitrosoxilopina (17), nitrosoisocoridina (16), nitrosoaporfina, figura 2 (CAROLLO et al., 2006; CAROLLO, SIQUEIRA, 2009).

Figura 2: Compostos isolados de *D. furfuracea*.



Fonte: SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2007b; SILVA et al., 2006; CAROLLO et al., 2004; HARADA, 2009; SILVA et al. 2012.

A literatura relata que os alcaloides aporfínicos demonstraram atividades farmacológicas, como antibacteriana, antifúngico (HUFFORD et al., 1980), antiviral (BOUSTIE et al., 1998), citotóxico (TEMPONE et al., 2005), antimalárico (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993), leishmanicida (CHAN-BACAB, PENÁ-RODRÍGUEZ, 2001), tripanocida e para o tratamento da doença de Parkinson (ZHANG et al., 2007).

Segundo MESQUITA et al. (2007), o extrato hexânico e etanólico demonstrou atividade antiprotozoária *in vitro* em relação a formas promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Tripanossoma cruzi*. E o extrato etanólico também demonstrou atividade larvicida sobre larvas do mosquito *Aedes aegypti* (COELHO et al. 2011).

1.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis (BORGES et al., 2011).

A oxidação (perda de um ou mais elétrons para outra substância) e redução (inverso da oxidação) é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. Porém, esta reação resulta na produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO's) que podem causar dano oxidativo, as principais espécies ERO's, são: oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de oxigênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), radical carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) e ($R_2C=O^{3+}$) (ALVES et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

O excesso de radicais livres no organismo leva ao estresse oxidativo (desequilíbrio entre o equilíbrio pró-oxidante / antioxidante em favor da situação pró-oxidante) que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres. Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos são relacionadas à doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, doenças pulmonares e doenças neurodegenerativas (MORAIS et al., 2009).

O consumo de antioxidante, encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres. Esses agentes podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Na classe dos enzimáticos estão: superóxido dismutase, catalase, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), quinona oxireductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo; e dentre os não enzimáticos estão: vitamina E e C, β -caroteno, flavonoides, curcumina, clorofilina, selênio, etc. Os antioxidantes não enzimáticos são encontrados em alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes. Os flavonoides, que pertencem à classe dos compostos fenólicos, que são uns dos principais antioxidantes presentes nos vegetais. Sua capacidade antioxidante é atribuída ao seu potencial de sequestrar radicais livre podendo inibir o processo de oxidação (MORAIS et al., 2009; ALVES et al., 2010).

Os compostos fenólicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas. Quimicamente, esta classe é definida como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, devido a sua estrutura molecular essa classe demonstra características antioxidante. De acordo com a literatura, existe cerca de 5 mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides ácido fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO, JORGE, 2007).

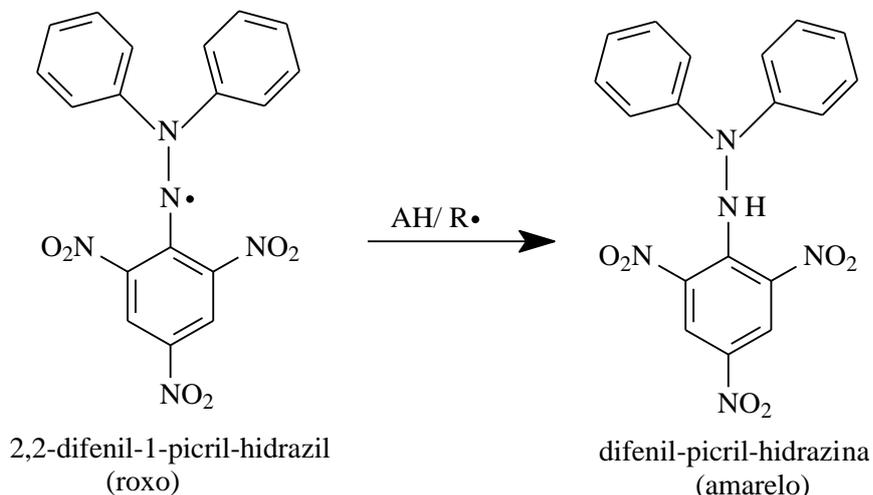
Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, não existindo assim um método universal. Contudo, o método utilizado tem que ser de acordo com os tipos de radicais livres gerados, como, onde e a extensão do dano causada pelos mesmos, portanto os principais métodos utilizados é o método de sequestro de radicais livres, co-oxidação, sequestros de radical peróxil, etc. (ALVES et al., 2010).

1.2.1 Sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método de sequestro de radicais livre DPPH é uma técnica é amplamente utilizada por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível, pois reage com substâncias doadores de elétrons e de hidrogênio. Baseia-se na capacidade dos antioxidantes naturais de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável DPPH. As substâncias antioxidantes reagem com o DPPH, que é um radical estável quando em forma de pó, de

coloração roxo/violeta, convertendo-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina, que possui coloração amarelada, como mostrado na reação da figura 3. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante da substância analisada, quando lido em absorvância 515 nm (ROESLER et al., 2007).

Figura 3: Reação de descoloração do DPPH.

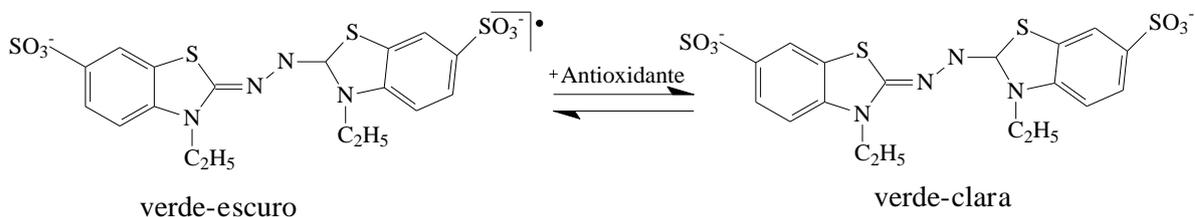


Fonte: OLIVEIRA, 2015.

1.2.2 Captura do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

Determina a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos através da captura do radical ABTS, podendo ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. A reação consiste na estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio, reação conforme a figura 4 (RUFINO et al., 2007).

Figura 4: Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: RUFINO et al., 2007.

De acordo com a literatura é possível obter o radical ABTS na presença de H_2O_2 , e na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, como os compostos fenólicos, podendo medir a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria, em

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da atividade antioxidante e estudo fitoquímico de *D. furfuracea*.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparação do extrato hidrometanólico das folhas de *D. furfuracea* e posterior fracionamento e isolamento dos principais constituintes
- Análise da composição química por cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massa (CL/EM) do extrato hidrometanólico das folhas de *D. furfuracea*;
- Teor de flavonoides, flavonol, taninos condensados e compostos fenólicos do extrato e frações;
- Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), captura do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e método β -caroteno/ácido linoleico

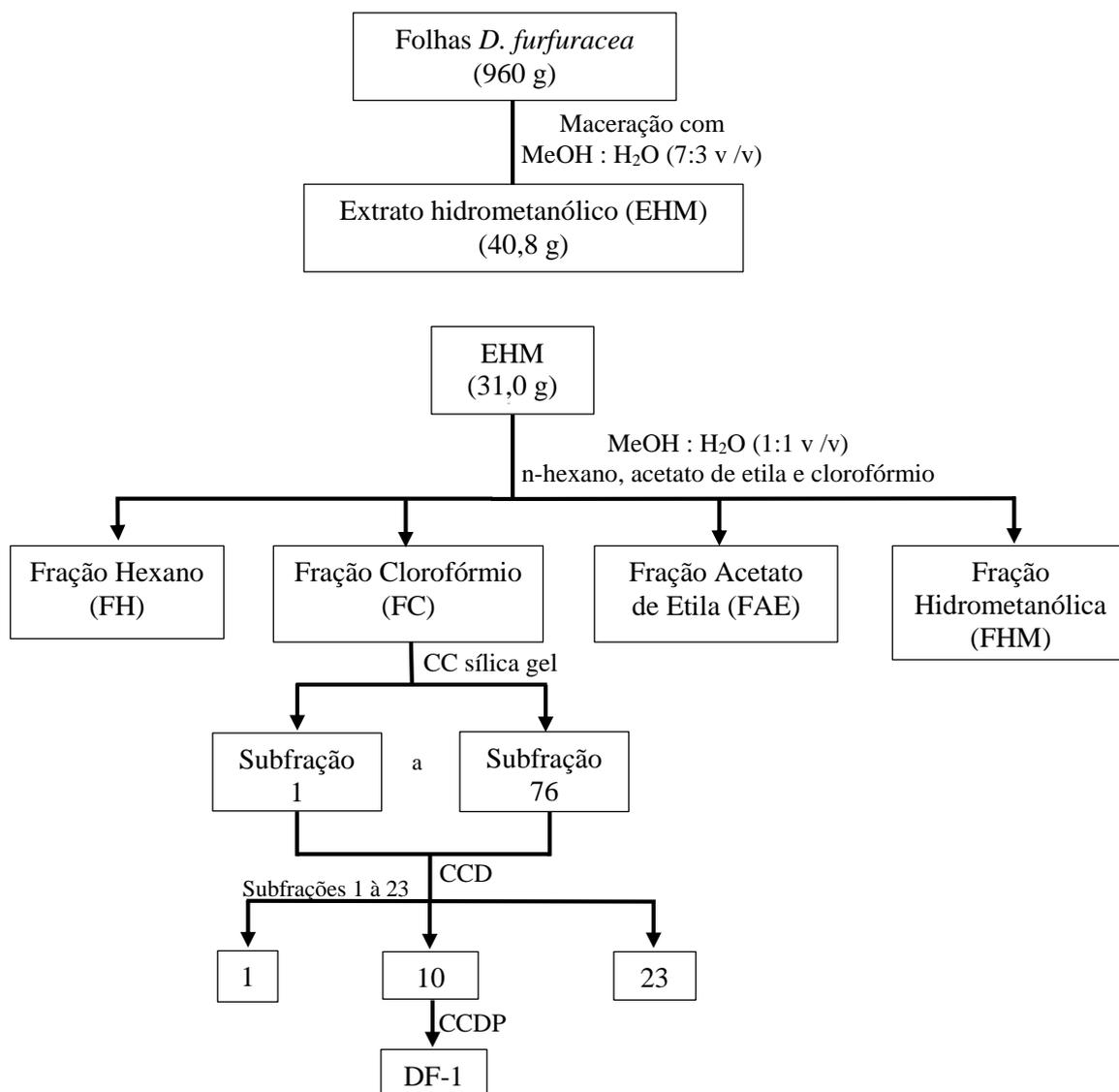
3. METODOLOGIA

3.1 Coleta do material vegetal

Folhas de *D. furfuracea* foram coletadas em maio de 2014 em Dourados, Mato Grosso do Sul e identificada pela profa. Dra. Zefa Valdevina Pereira e uma exsicata (DDMS-166) depositada no herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados-MS.

3.2 Extração e isolamento dos constituintes químicos

Folhas de *D. furfuracea* (960 g) foram exaustivamente extraídas por maceração com metanol (MeOH) : água (H₂O) (7:3 v / v) a temperatura ambiente. O solvente foi eliminado por evaporador rotativo e posteriormente liofizado para obtenção do extrato hidrometanólico (40.8 g). Parte do extrato (31.0 g) foi dissolvido em MeOH : H₂O (1:1 v / v) e particionado com *n*-hexano, clorofórmio (CHCl₃) e acetato de etila. Os solventes foram evaporados resultando nas frações hexano (FH, 4.3 g), clorofórmio (FC, 6.9 g), acetato de etila (FAE, 10.5 g) e hidrometanólica (FHM, 8.60 g). A FC (2.5 g) foi fracionada em coluna cromatográfica (CC) de sílica gel eluída com mistura de CHCl₃: MeOH, em gradiente de polaridade, obtendo 76 sub-frações, que após visualização por cromatografia em camada delgada (CCD) foram reunidas em 23 sub-frações (FC-1 a FC-23). Parte da sub-fração FC-10 (634,0 mg) foi purificada em cromatografia em camada delgada por partição (CCDP) (CHCl₃:MeOH 30%) fornecendo um composto codificado como DF-1.



3.3 Análise fitoquímica

O composto isolado foi identificado através da análise por ressonância magnética nuclear (RMN). As medições por RMN foram realizadas em um espectrômetro *Varian Mercury Plus BB* operando a 300 MHz para ^1H e 75.5 para ^{13}C , utilizando CD_3OD como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. A estrutura do compostos foi esclarecida pelo dados obtidos da análise pelo RMN juntamente com os dados relatados na literatura.

3.4 Perfil fitoquímico por CL-EM

A composição química do extrato hidrometanólico foi realizada por cromatografia líquida (CL) com sistema ternário de distribuição de solventes equipado com um amostrador automático, um detector de matriz de fotodiodos e, acoplado a um espectrômetro de massa (EM) com sistema (Brucker) em espectrômetro de modo Quadrupolo. O espectrômetro de massa foi executado no modo de ionização positiva e negativa usando o *ionization electrospray* (ESI), com relação massa para carga (m/z) no intervalo de m/z 60-1000. A coluna cromatográfica utilizada foi de C-18 (25 cm \times 4.6

mm, 5 µm), com uma pequena pré-coluna (2,5 cm × 3 mm) contendo a mesma embalagem, utilizado para proteger a coluna analítica. Para cada análise utilizou uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min com volume injetado de 10 µL. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 25 ° C.

A eluição foi realizada utilizando o seguinte gradiente de solventes de ácido fórmico 0,1% : acetonitrila (80:20, v / v) tendo 35 min para se obter 35% de ácido fórmico 0,1% e 65% acetonitrila e, em seguida, retornando em exatamente 5 min para as condições iniciais.

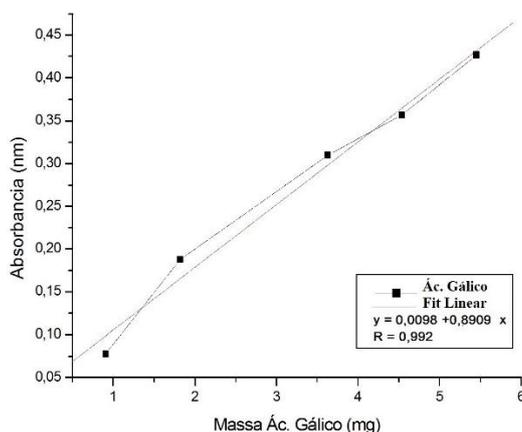
3.5 Teor de constituintes

Foi realizado os teste de teor de constituintes (fenóis, taninos condensados, flavonoides e flavonol) nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica.

3.5.1 Concentração de fenóis totais

A concentração de total de fenóis das frações hidrometanólica, clorofórmio e acetato foi determinada utilizando o reagentes Folin (MAXSON, ROONEY, 1972). Em resumo, foi misturado 100 µL de cada amostra (1 g/L) com 1,0 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v / v). Após a mistura, adicionaram-se 1,5 mL de bicarbonato de sódio aquoso 2%. A mistura foi deixada em repouso por 30 min, com agitação intermitente. A absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro de monocanal. A concentração de fenóis total como equivalente de ácido gálico em mg por grama de amostra (EAG mg/ g amostra), a partir da equação da reta da figura 6. Utilizou metanol como branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 6: Equação da reta para fenóis.

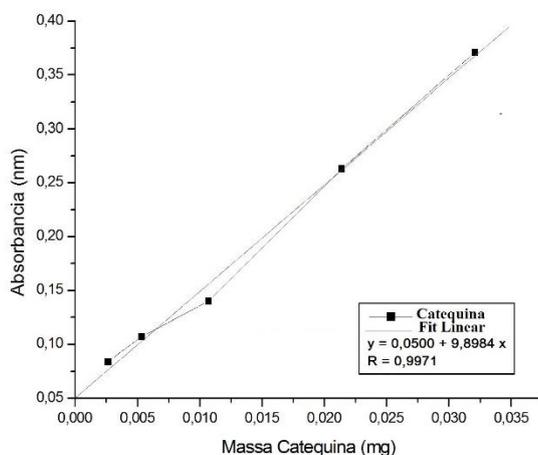


3.5.2 Concentração de taninos condensados

A concentração total de taninos condensados foi determinada por uma versão modificada de um método relatado anteriormente por MAXSON, ROONEY, 1972; LIN, TANG, 2007. As amostras foram misturadas com 5 mL de vanilina-HCl (8% de HCl aquoso e 4% de vanilina em metanol). A absorbância foi lida em 500 nm depois de 20 min de repouso. A catequina foi utilizada como padrão. A concentração de taninos

condensado é expressa como equivalentes de catequina em mg por grama de amostra (ECAT mg/ g amostra), a partir da equação da reta da figura 7.

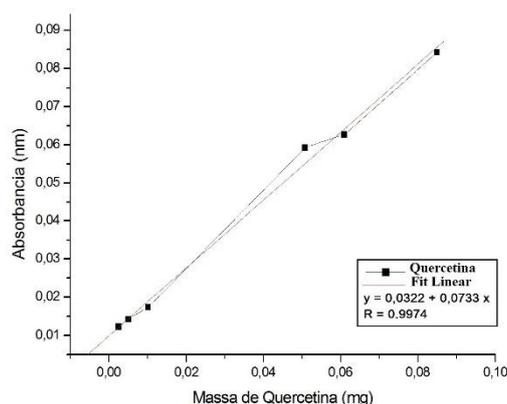
Figura 7: Equação da reta para taninos.



3.5.3 Concentração de flavonoides

A quantidade de flavonoides nas frações, foi medida espectrofotometricamente conforme relatado por LIN, TANG, 2007. Em resumo, misturaram-se 500 μ L de cada fração com 1,50 mL de etanol 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio a 10% ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), 0,10 mL de acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$) (1 M) e 2,8 mL de água destilada. Após 40 min de incubação, a absorbância foi medida a 415 nm utilizando um espectrofotômetro de monocanal. Para o cálculo da concentração de flavonoides preparou-se uma curva de calibração da figura 8 utilizando a quercetina como padrão. A concentração de quercetina é expressa em equivalentes de quercetina em mg por grama de amostra (EQ mg/ g amostra). Foi realizado em triplicata.

Figura 8: Equação da reta para flavonóides e flavonol.



3.5.4 Concentração de flavonol

Os flavonóis das amostras foram estimados pelo método relatado por Maxson, Rooney, (1972); Brand-Williams et al., (1995). A 2 mL de amostra, foram adicionadas 2 mL de $AlCl_3$ (2% em etanol) e 3 mL (50 g/L) de acetato de sódio. A mistura foi agitada e incubada durante 2,5 h a 20°C. A absorbância foi lida a 440 nm. Os flavonóis são expresso

em mg de quercetina equivalente por grama de amostra (EQ mg/ g amostra), utilizando a curva de calibração com quercetina da figura 8.

3.6 Determinação da atividade antioxidante

3.6.1 Sequestro de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)

Para o preparo das amostras (FC, FAE, FHM e extrato hidrometanólico) diluiu 0,01g de amostra em 10 mL de metanol-CLAE, obtendo uma concentração de 1,0 mg / mL. Em seguida foi feita uma diluição em série utilizando (10, 25, 50, 100, 200 e 400 µL) de cada amostra com 2 mL da solução de DPPH (0,1mM), preparada previamente. A mistura permaneceu incubada durante 30 min à temperatura ambiente na ausência de luz. A leitura foi realizada no espectrofotometro, a absorbância foi medida a um comprimento de onda de 515 nm contra um branco contendo todos os reagentes exceto as amostras de teste. Os ensaios foram realizados em triplicata. Utilizou-se butil-hidroxitolueno (BHT) como controle positivo. A percentagem de inibição de DPPH (I%) foi calculada utilizando a seguinte equação (HARBORNE, WILLIAMS, 2000):

$$I\% = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

Onde A_0 é a absorbância da solução de DPPH (controle) e A é a absorbância final da amostra, decorridos 30 min de reação. Utilizando os dados da regressão linear foi calculado o valor do IC_{50} que é a concentração necessária para inibir 50% dos radicais livres.

3.6.2 Método β -caroteno/ácido linoleico

A emulsão de β -caroteno/ácido linoleico foi realizada solubilizando 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio, em seguida, 1 mL de solução de β -caroteno-clorofórmio foram misturados 20 mg de ácido linoleico e 200 µL de Tween 40. Subsequentemente, o clorofórmio foi removido por um evaporador rotativo durante 5 min a 45 ° C. Adicionou-se lentamente 50 mL de água destilada e em seguida agitou a solução vigorosamente até formar uma emulsão. Para o preparo das amostras, misturou 5 mL da emulsão com 200 µL dos amostra, em um tubo de ensaio. O controle foi preparado com 200 µL de metanol mais 5 ml de emulsão. A leitura foi efetuada a 470 nm. Os tubos foram colocados num banho de água a 50 ° C e a oxidação foi monitorada verificando a absorbância a cada intervalo de 15 minutos até a cor do β -caroteno na amostra de controle ter desaparecido (~ 105 min). As análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentagem de inibição de acordo com o controle utilizando a equação seguinte (MATTOS et al., 2009):

$$\%AA = [1 - (A_i - A_t)] / (A'_i - A'_t) \times 100$$

A_i = absorbância da amostra em tempo zero; A_t = absorbância da amostra após incubação (105 min) a 50 ° C; A'_i = absorbância do controle no tempo zero; A'_t = absorbância do controle após incubação (105 min) a 50 ° C.

3.6.3 Captura do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

A atividade antioxidante também foi medida utilizando o método de RUFINO et al., (2007) com modificações de remoção do radical livre ABTS (2,2'-azinobis(3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Resumidamente, 7,0 mM de ABTS e 140 mM de persulfato de potássio foram misturados e mantidos na ausência de luz durante 16 h à temperatura ambiente. A solução da amostra (1 mg/mL) foi diluída nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125, 250 µg/mL em metanol. Antes do uso, a solução de ABTS foi diluída para obter uma absorbância de $0,700 \pm 0,05$ a 734 nm com etanol (P.A.). Em seguida, adicionou-se 3 mL de solução ABTS diluída a 30µL de diferentes concentrações da solução da amostra (5-250 µg/mL). Após 30 min, realizou a leitura (734 nm) utilizando espectrofotômetro, utilizando etanol (P.A.) como branco. A atividade antioxidante do ABTS foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{ABTS}(\%) = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

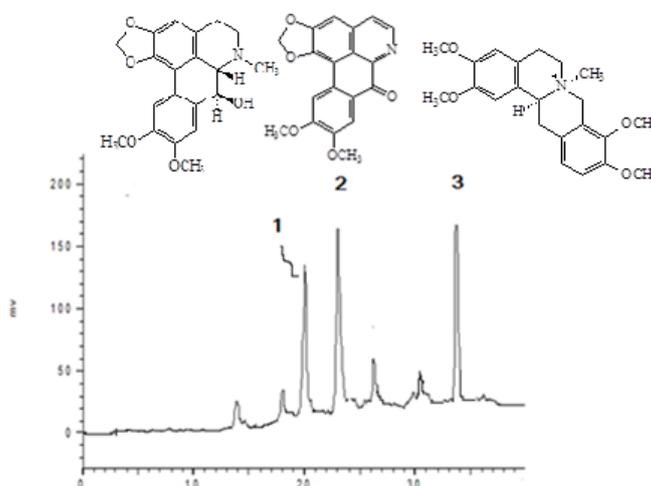
A_0 é a absorbância da solução branco e A é a absorbância da amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Constituintes químicos

No presente estudo, a análise do cromatograma de CL-EM exibiu os picos majoritários nos tempos de retenção de 20,5 min para duguetina (1), 23,4 min para a dicentrinona (2) e 34,3 min para N-metilglaucina, figura 9.

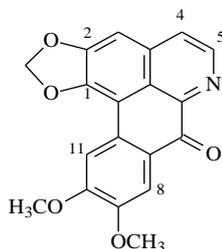
Figura 9: Cromatograma de CL/EM do extrato hidrometanólico, juntamente com as estruturas molecular dos compostos identificados.



O estudo fitoquímico da FC por cromatografia em coluna (CC) e posterior cromatografia em camada delgada (CCDP), resultou no isolamento do composto codificado como DF-1. Que após foi analisar os dados obtidos por RMN de ^1H e juntamente com a comparação com a literatura (PHYTOCHEMISTRY, 1986). O espectro de ^1H apresentou sinais de hidrogênios oximetilicos como singleto na região de 4.21 (3H, s, OMe) e 4.22 (3H, s, OMe); dois hidrogênios metilenodioxí como singleto na região 6.84 (2H, s, OCH_2O); dois hidrogênios singletos na região 7.85 (1H, s, H-8), 8.18 (1H, s, H-11) do carbonos 8 e 11, respectivamente e dois hidrogênios dubletos na região de 8,32

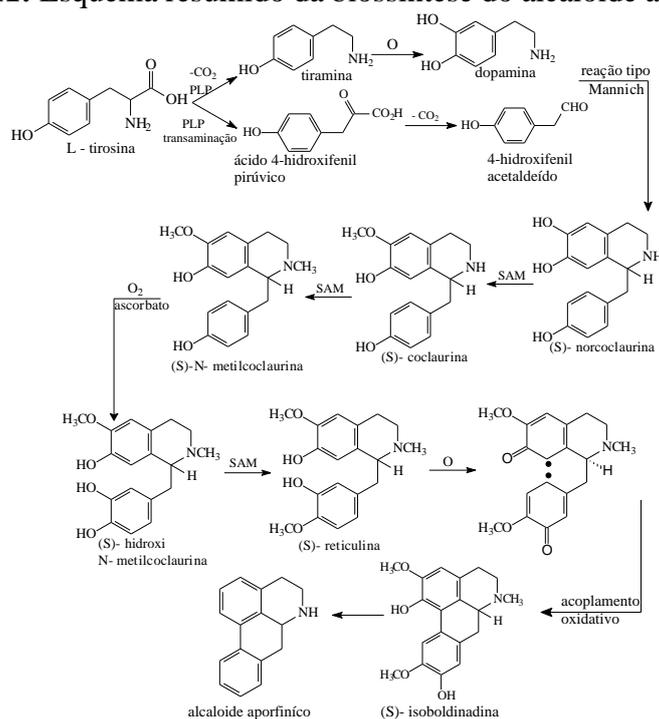
(1H, d, J = 6.5Hz, H-4) e 8.66 (1H, d, J = 6.5Hz, H-5) referentes ao carbono 4 e 5, respectivamente. Confirmou que o composto isolado foi o alcaloide dicentrinona, figura 10.

Figura 10: Estrutura da dicentrinona com a numeração dos carbonos principais.



Estudos fitoquímicos mostraram que *D. furfuracea* apresenta-se como componentes principais, os alcaloides aporfínicos, flavonóides e sesquiterpenos (SANTOS, SALATINO, 2000; SILVA et al., 2009). Os alcaloides aporfínicos tem origem principal a partir da rota biossintética que tem como precursor o aminoácido L-tirosina (Figura 11). Os alcaloides pertencem a esse grupo, em que pode ser identificado a estrutura proveniente do aminoácido tirosina (DEWICK, 2002).

Figura 11: Esquema resumido da biossíntese do alcaloide aporfínico.



Fonte: DEWICK, 2002.

4.2. Atividade antioxidante

Foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato hidrometanólico, e das FC, FAE e FHM da *D. furfuracea*, pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH, ABTS e inibição da co-oxidação do β -caroteno. Os resultados das avaliações da atividade antioxidante são apresentados na tabela 1. As substâncias antioxidantes presentes nos extratos reagem com o DPPH que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-

picril hidrazina. O grau de descoloração indica o potencial antioxidante da amostra. Uma amostra que apresenta potencial em sequestrar radicais livres possui baixo valor de IC_{50} , ou seja uma pequena quantidade é capaz de decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50%, ou seja, inibir a oxidação do radical em 50% (ROESLER et al., 2007).

O extrato hidrometanólico e a FC demonstraram melhor capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical DPPH, com valor de $IC_{50} = 7,14 \mu\text{L/mL}$ e $IC_{50} = 8,35 \mu\text{L/mL}$, figura 14, respectivamente. A FHM apresentou um valor de $IC_{50} = 22,46 \mu\text{L/mL}$, figura 13, e a FAE exibiu um valor $IC_{50} = 7,14 \mu\text{L/mL}$, figura 12. Em comparação com o padrão BHT ($IC_{50} = 16,42 \mu\text{L/mL}$), o extrato hidrometanólico e FAE demonstraram potente atividade antioxidante, já a FHM e FAE em relação a este método apresentaram uma baixa atividade antioxidante. Em relação ao método de sequestro de radicais livres utilizando reagente ABTS, a FHM apresentou melhor atividade antioxidante (66,30%) quando comparado com as demais frações, talvez por possuir mais compostos hidrofílico e lipofílico. A FAE exibiu uma atividade antioxidante moderada com %AA = 56,42, pois o BHT demonstrou melhor atividade antioxidante do que as amostras analisadas com %AA = 96,40 de atividade sequestradora do radical ABTS. Neste método a FC apresentou a menor atividade antioxidante com %AA = 14,12. Portanto estes resultados mostram que as FAE e FHM são eficazes como doadores de átomos de hidrogênio ou elétrons.

Figura 12: Percentual da atividade antioxidante pelo método sequestro de radicais livre utilizando o reagente DPPH, em função da concentração da FAE.

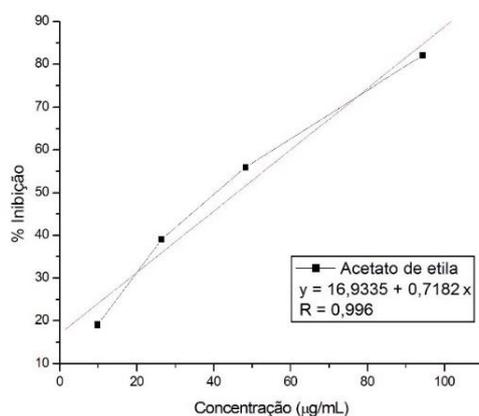


Figura 13: Percentual da atividade antioxidante pelo método sequestro de radicais livre utilizando o reagente DPPH, em função da concentração da FHM.

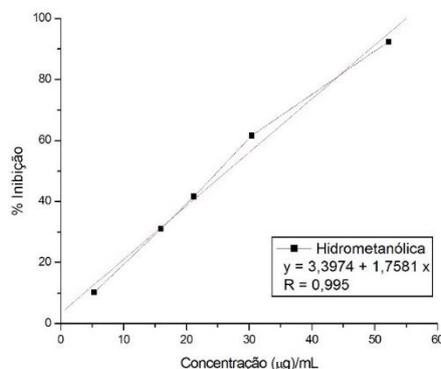
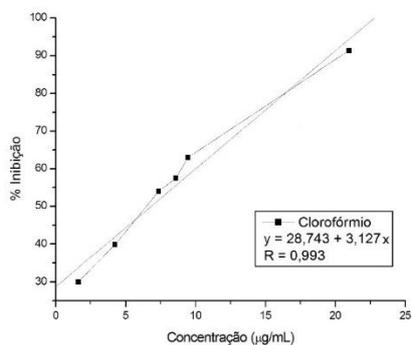


Figura 14: Percentual da atividade antioxidante pelo método sequestro de radicais livre utilizando o reagente DPPH, em função da concentração da FC.



O método de branqueamento de β -caroteno avalia a capacidade de uma substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-a dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Essa oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam o cromóforo do β -caroteno resultando no clareamento da emulsão reacional (MATTOS et al., 2009; ALVES et al., 2010). Neste método os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante, como mostrado na figura 15. A FHM, neste teste, exibiu a maior atividade antioxidante com %AA = 84,59 quando comparado ao padrão BHT, descrito na tabela 1. Portanto propõe-se que essa fração contenha compostos lipofílicos, que atuam inibindo ou retardando a oxidação do β -caroteno. O mesmo não foi observado para a FC pois exibiu uma baixa atividade antioxidante, em relação a este método.

Figura 15: Curva dos resultados referentes ao método do teste β -caroteno/ácido linoleico.

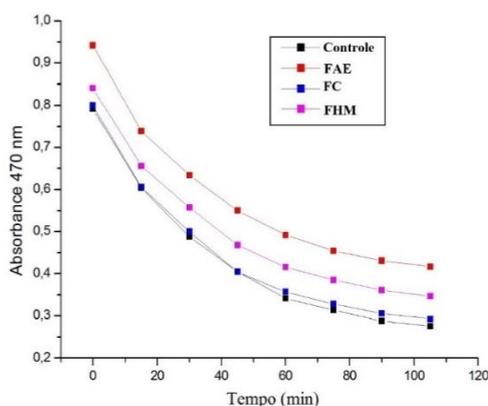


Tabela 1: Atividade antioxidante das frações de *D. furfuracea*.

Amostra	Teste		
	DPPH	β -caroteno/ácido linoleico	ABTS
	IC ₅₀ (µg/mL)	%AA	%AA
FC	8,35	n.d.	14,12
FAE	36,32	53,33	56,42
FHM	22,46	84,59	66,30
Extrato	7,14	-	15,41
BHT	16,72	91,20	96,40

FC = fração clorofórmica; FAE = fração acetato de etila; FHM = fração hidrometanólica; IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% de DPPH, derivada do gráfico de I% (percentagem de inibição) versus concentração em µg/mL; BHT = butil-hidroxitolueno %AA = atividade antioxidante, avaliada pelo método β-caroteno / ácido linoleico n.d. = não determinado.

Segundo SOUSA et al. (2007), as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos está relacionada à sua estrutura química e propriedade redutora, sendo estas características importantes no sequestro de radicais livres, bem como na quelação de metais de transição.

O teor dos constituintes fenólicos (flavonoides, fenóis, taninos e flavonol) são mostrados na tabela 2. Onde o conteúdo de flavonoides e flavonol é expresso por mg EQ/ g amostra, os conteúdos de fenóis estão expressos em mg EAG/ g amostra e a concentração de taninos condensado foi calculado em mg ECAT/ g amostra.

Tabela 2: Teor dos constituintes presentes nas frações hidrometanólica, acetato de etila e clorofórmica de *D. furfuracea*.

Amostra	Flavonoides (mg EQ/ g amostra)	Fenóis (mg EAG/ g amostra)	Taninos Condensado (mg ECAT/g amostra)	Flavonol (mg EQ/ g amostra)
FC	20,61	29,69	7,88	n.d.
FAE	57,46	47,49	27,92	n.d.
FHM	47,57	40,78	28,00	25,75

FC = fração clorofórmica; FAE = fração acetato de etila; FHM = fração hidrometanólica; n.d. = não determinado; EQ = equivalente de quercetina; EAG = equivalente de ácido gálico; ECAT = equivalente de catequina.

Com base nos resultados obtidos, os compostos de natureza fenólica concentram-se majoritariamente na FAE e na FHM, principalmente de flavonoides e fenóis, isto justifica a maior capacidade antioxidante das frações, tendo em vista os resultados da atividade antioxidante, tabela 1, quando avaliados pelo método de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS e o método de branqueamento β-caroteno. Todas as amostras exibiram baixo teor de taninos condensados. A FHM exibiu também uma baixa concentração de flavonol de 25,75 mg EQ/ g amostra. Não foi determinada a concentração de flavonol das demais frações.

Na literatura estudos fitoquímicos sobre outros gêneros da família Annonaceae também demonstraram baixo teor de flavonoides e fenóis. De acordo com ROSA (2015) a *Annona crassiflora* (Annonaceae) exibiu uma concentração de fenóis e flavonóides na fração acetato de etila de 70,20% e 7,22%, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que está família não exibiu uma concentração alta de compostos fenólicos, sendo os alcaloides seus principais constituintes.

5. CONCLUSÃO

De acordo este estudo, a análise do extrato hidrometanólico por LC-MS apresentou três componentes alcaloides majoritários: duguetina, dicentrinona e N-metilglaucina. Além disso, dentre as frações analisadas as FAE e FHM demonstraram maior potencial antioxidante em diferentes ensaios *in vitro*, tendo como padrão o BHT. Todas as amostras analisadas exibiram baixos teores de compostos fenólicos, porém mesmo em pouca quantidade os compostos fenólicos podem estar agindo como antioxidantes, assim podemos atribuir a atividade antioxidante à presença de alcaloides

aporfínicos e oxaporfínicos e aos compostos fenólicos presentes no extrato hidrometanólico das folhas de *D. furfuracea*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quím. Nova*, v. 33, n. 10, 2202-2210, 2010.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Int. Adolfo Lutz*, 66, 1-9, 2007.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, 7, 12, 1-20, 2011.

BOUSTIE, J.; STIGLIANI, J.L.; MONTANHA, J.; AMOROS, M.; PAYARD, M.; GIRRE, L. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *J. Nat. Prod.* 61, 480–484, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BENSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25–30, 1995.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI, J. Avaliação da atividade antioxidante de composto fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 902, 2007.

CAROLLO, C. A., HELLMANN A. R., SIQUEIRA J. M. Sesquiterpenoids from volatile oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Bioch Syst Ecol*, 33, 647-649, 2005.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M.; HELLMANN, A. R.; FABRI, J. R. Alcaloides das folhas de *Duguetia furfuracea*. 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) e XXVI Federacion Latinoamericana de Asociaciones Químicas (FLAQ), 2004.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M.; GARCEZ, W. S.; DINIZ, R.; FERNANDES, N. G. N-Nitrosoanonaine and N-Nitrosoxylopine, Aporphine Alkaloids from *Duguetia furfuracea*. *Journal of Natural Products*, 69, 1222-1224, 2006.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J.M. Isolation of a minor nitro-alkaloid from the aerial parts of *Duguetia furfuracea*--Annonaceae. *Natural Products Research*, 23, 633-637, 2009.

CHAN-BACAB, M. J.; PENÃ-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 674–688, 2001.

COELHO, L. S.; FELICIO, L. P.; MIRANDA, C. T.; SILVA, E. M.; VALE, C. R.; LIMA, D. C.; DUARTE, S. R.; FERREIRA, H. D.; CHEN CHEN, L.; CARVALHO, S.

Modulatory effects of *Duguetia furfuracea* (A. St. Hil) Benth. and Hook. f. in *Drosophila melanogaster* somatic and germinative cells. *Genetics Molecular Research*, 10, 75-85, 2011.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach*. 2 ed. UK: Wiley&Sons, 322-340, 2002.

FISCHER, D. C.; AMORIM, G. N. C.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. D. E. O.; YOGI, A.; SANTI, S. M.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, P. R. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica*, 92, 261-266, 2014.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem REBEn*, 61, 2, 202, 2008.

HARADA, T. N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia Saline* Leach e atividade antineoplástica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, 2009.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504, 2000.

HUFFORD, C. D.; SHARMA, A. S.; OGUNTMEIN, B. O. Antibacterial and antifungal activity of lirioidenina and related oxoaporphine alkaloids. *J. Pharm. Sci.* 69, 1180–1183, 1980.

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *J. Nat. Prod.*, 56, 1468–1478, 1993.

LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.*, 101, 140–147, 2007.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2000.

MATTOS, L. M.; MORETTI, C. L.; MUNIZ, L. B.; SILVA, E. Y. Y. Determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico. *Embrapa Agroindústria Tropical/Comunicado Técnico*, 68, 1-3, 2009.

MAXSON, E. D.; ROONEY, L.W. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.*, 49, 719–729, 1972.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 165-170, 2007.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 315-316, 2009.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 17, 1, 36-44, 2015.

PHYTOCHEMISTRY. v. 25, n. 8, 1999 – 2000, 1986.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L.C; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27, 1, 53-60, 2007.

ROSA, C. P. Estudo da composição química e avaliação da atividade biológica de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae). **Disseratação** (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. *Embrapa Agroindústria Tropical/Comunicado Técnico*, 128, 1-4, 2007.

SANTOS, D. Y., SALATINO, M. L. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry* 55, 567-573, 2000.

SILVA, D. B. Estudo fitoquímico e avaliação alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* (A. ST. – HILL.) BENTH. & HOOK F. – Annonaceae. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, 2006.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGILIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação do atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Quím. Nova*, 30, 8, 1809-1812, 2007a.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; GARCEZ, W. S.; NASCIMENTO, E. A.; SIQUEIRA, J. M. Chemical Constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Journal Brazilian Chemistry. Soc.*, 18, 8, 1560-1565, 2007b.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C.; MILITAO, G. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALBUQUERQUE, S.; SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*, 16, 1059-1063, 2009.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desrepliação de alcaloides aporfínicos e oxaporfínicos de *Unonopsis guatterioídes* por ESI-IT-MS. *Quím. Nova*, 35, 5, 944-947, 2012.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*, 30, 2, 5-351, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 82-85, 2005.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA; S. E. T.; JR., H. F. A.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FRISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, 12, 382-390, 2005.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; SIQUEIRA, J. M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Ver. Bras. de Farmacognosia*, 18, 3, 374, 2008.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova*, 30, 5, 1323-1338, 2007.

ZHANG, A.; ZHANG, Y.; BRANFMAN, A.R.; BALDESSARINI, R.J.; NEUMEYER, J.L. Advances in development of dopaminergic aporphinoids. *J. Med. Chem.* 50, 171-181, 2007.